

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 690 926

②1 N° d'enregistrement national :

92 05579

⑤1 Int Cl<sup>5</sup> : C 12 M 1/40, 3/00

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 06.05.92.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 12.11.93 Bulletin 93/45.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : L.V.M.H. RECHERCHE — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Boulay Michel, Deloire Alain, Mauro  
Marie-Claude, Meybeck Alain, Pierry Guy et Rabaud  
Jean Noël.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Regimbeau Martin Schrimpf  
Warcoin Ahner.

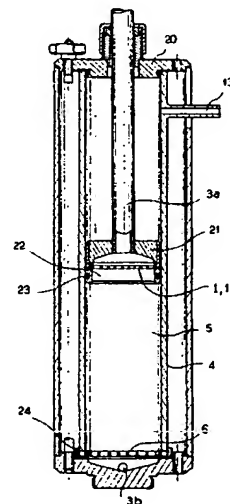
⑤4 Dispositif du type réacteur à volume variable et procédé de culture cellulaire.

⑤7 Dispositif du type réacteur destiné à mettre en contact  
des particules solides avec un liquide, dispositif compor-  
tant:

- une enceinte (5) délimitée par des parois, destinée à se  
remplir dudit liquide et à contenir lesdites particules solides  
en contact avec le liquide,
- des moyens d'alimentation et d'évacuation du liquide  
(3a, 3b) de l'enceinte,

caractérisé en ce qu'au moins l'une desdites parois (1) de  
l'enceinte peut être mobile de sorte que l'enceinte a un vo-  
lume variable.

La présente invention concerne aussi des procédés de  
réactio ou culture à l'aide de ce dispositif (Figure 3).



FR 2 690 926 - A1



DISPOSITIF DU TYPE REACTEUR A VOLUME VARIABLE ET PROCEDE DE  
CULTURE CELLULAIRE

La présente invention concerne un dispositif du type réacteur,  
5 utile pour mettre en contact des particules solides avec un liquide. Lesdites  
particules étant généralement fines, bien que non nécessairement, le  
dispositif de l'invention peut constituer un appareil de culture cellulaire en  
milieu liquide, lesdites particules comprenant alors des cellules. Ce  
10 dispositif comporte une enceinte destinée à se remplir complètement dudit  
liquide et à contenir lesdites particules solides en contact avec le liquide. Il  
comprend ainsi des moyens d'alimentation et d'évacuation du liquide de  
l'enceinte et des moyens de retenue desdites particules solides et  
séparation d'avec le liquide pour maintenir celles-ci à l'intérieur de  
15 l'enceinte dans une zone déterminée et éventuellement des moyens de  
circulation et traitement du liquide en dehors de l'enceinte. La présente  
invention a également pour objet un procédé pour réaliser la réaction des  
particules avec le liquide, notamment un procédé de culture de cellules en  
milieu liquide à l'aide d'un tel dispositif.

Un réacteur de ce type a été décrit dans la demande de brevet  
20 internationale WO 86 05202. Toutefois, le dispositif décrit antérieurement  
ne disposait pas d'un volume variable. Or précisément, dans certains cas, tel  
que la culture d'embryons somatiques de végétaux, il apparaît qu'il peut  
être avantageux, voire nécessaire, d'effectuer une culture à densité volumé-  
trique constante de cellules pour avoir un développement correct des  
25 embryons ou même de diminuer cette densité par l'augmentation du volume  
de l'enceinte de culture, en partie à cause du relargage de certains  
composés lors de la maturation des embryons, ces composés pouvant avoir  
un effet stimulateur ou inhibiteur de la maturation.

Par ailleurs, le réacteur décrit dans la demande de brevet  
30 précitée comporte, à proximité de la zone de culture, une hélice (28)  
destinée à créer une circulation du milieu liquide, de telle sorte qu'elle  
maintienne les particules solides ou cellules en régime de lit fluidisé. Or,  
cette disposition comporte le risque de blessure ou d'altération des  
particules ou des cellules, en particulier si celles-ci s'échappent du lit  
35 fluidisé, par exemple en cas de dérèglement ou de dysfonctionnement du  
système.

Le but de la présente invention est de fournir un réacteur à volume variable qui, en outre, pallie aux inconvénients précités du réacteur.

Pour ce faire, la présente invention fournit un dispositif du type réacteur destiné à mettre en contact des particules solides avec un  
5 liquide, comportant :

- une enceinte délimitée par des parois, destinée à se remplir dudit liquide et à contenir lesdites particules solides en contact avec le liquide, et
- des moyens d'alimentation et d'évacuation du liquide de l'enceinte,  
10 caractérisé en ce qu'au moins l'une desdites parois de l'enceinte peut être mobile de sorte que l'enceinte a un volume variable.

Dans un mode de réalisation du dispositif selon l'invention l'enceinte définit, en partie au moins, un cylindre, ladite paroi mobile de l'enceinte étant constituée par une base du cylindre.

15 En particulier, l'enceinte définit en partie au moins un cylindre qui coopère de façon étanche avec un piston lequel peut être déplacé à l'intérieur du cylindre de manière à faire varier le volume de l'enceinte en fonction de sa position, la base du piston constituant une paroi mobile de l'enceinte.

20 De façon appropriée, l'enceinte est constituée d'une colonne cylindrique, les moyens d'alimentation et évacuation du liquide étant situés à chaque extrémité de celle-ci, l'une de ces extrémités étant constituée par ledit cylindre et ledit piston, et le piston incluant un moyen d'alimentation ou d'évacuation du liquide de l'enceinte à l'une des extrémités de la  
25 colonne, un autre moyen d'alimentation ou d'évacuation du liquide étant situé à l'autre extrémité.

Dans un mode de réalisation particulièrement utile, notamment pour la culture de cellules, d'agréats cellulaires ou de tissus, le réacteur comporte des moyens de retenue desdites particules et séparation  
30 d'avec le liquide pour maintenir celles-ci à l'intérieur de l'enceinte.

Lesdits moyens de retenue des particules et séparation d'avec les liquides peuvent consister dans deux grilles dont la maille ne laisse pas passer les particules solides, ces moyens délimitant, avec les autres parois de l'enceinte, une zone de contact entre liquide et particules solides.

35

Avantageusement, le maillage des grilles sera choisi notamment en fonction de l'un ou plusieurs des paramètres suivants, accessibles à l'homme de l'art : dimensions et densité des particules par rapport au milieu liquide, ainsi que vitesse souhaitée de ce milieu, de  
5 manière à ce que, dans un mode particulier de mise en oeuvre de l'invention, on puisse maintenir les particules en régime de lit fluidisé. Par exemple, dans le cas où les particules sont des agrégats cellulaires végétaux, le maillage peut être de 30 microns environ.

La taille des particules solides selon l'invention peut être  
10 choisie dans une large gamme. Elle est comprise en général entre 1  $\mu\text{m}$  et 5 cm.

Pour des particules supérieures à 20  $\mu\text{m}$ , c'est-à-dire retenues par des mailles de 20  $\mu\text{m}$ , les grilles pourront, par exemple, être constituées par une toile notamment en inox, prise dans un cadre, ou d'un  
15 disque de matériau fritté tel que de l'inox fritté.

Pour des particules inférieures à 20  $\mu\text{m}$ , on utilisera plutôt, à titre de grilles, des membranes de filtration de pores inférieures à la taille des particules.

La dimension des mailles ou pores des grilles ou membranes  
20 respectivement, sera, selon l'invention en général, de 0,5  $\mu\text{m}$  à quelques millimètres, par exemple 5 mm.

Dans un mode de réalisation particulier, ladite paroi mobile, notamment la base du piston, incorpore un moyen de retenue des particules solides et de séparation du liquide, notamment de type grille telle que  
25 décrite ci-dessus.

De façon appropriée, dans le dispositif selon l'invention, l'enceinte peut être constituée d'une colonne cylindrique comportant une paroi cylindrique et deux parois d'extrémités formant les bases dudit cylindre, ces dernières comportant des grilles permettant l'entrée, la  
30 circulation et la sortie du milieu liquide de l'enceinte, mais retenant les particules à l'intérieur de l'enceinte, l'une au moins de ces deux grilles étant mobile.

Dans un mode particulier de réalisation du dispositif selon l'invention, l'enceinte comporte une ouverture obturable pratiquée dans sa  
35 paroi, permettant l'introduction de particules dans l'enceinte, ou encore

l'introduction, ou le prélèvement, partielle ou totale du milieu contenant les particules solides. Le cas échéant, on préférera que ladite ouverture communique avec l'intérieur de l'enceinte uniquement lorsque l'enceinte atteint un certain volume, en particulier lorsque le volume de l'enceinte est maximum. Ainsi aucune perturbation ne risque de se produire au niveau de ladite ouverture au cours du processus de culture ou de réaction mis en oeuvre avec des volumes d'enceinte inférieurs.

En général, le dispositif selon l'invention comprend des moyens de circulation et traitement du liquide en dehors de l'enceinte, comportant notamment une canalisation, une pompe de préférence à débit variable et de préférence encore étant du type permettant d'inverser le sens du courant du milieu liquide, et éventuellement un récipient formant réservoir de milieu liquide, et des pinces d'isolement situées respectivement à l'entrée et à la sortie de l'enceinte et dudit récipient.

En particulier, ledit récipient peut comporter différents moyens pour contrôler, modifier et/ou homogénéiser la composition du milieu liquide, tels que par exemple des capteurs mesurant la température, le pH ou la concentration des gaz dissous, et des moyens de prélèvement du milieu ou d'addition de différentes substances ou compositions telles que milieu frais ou constituants de ce milieu, sous forme liquide, dissoute et/ou gazeuse.

Selon un mode de réalisation particulier, le dispositif comprend une canalisation supplémentaire, munie de préférence d'une pince d'isolement, permettant de réaliser une boucle de circulation du milieu liquide, ladite boucle incluant l'enceinte et la pompe, mais isolant le récipient précité formant réservoir.

Suivant un autre mode de réalisation particulier, le dispositif selon l'invention comporte en outre, notamment au niveau dudit récipient formant réservoir, des moyens permettant de soutirer, en alternance ou en continu, au moins une partie du milieu et de traiter celui-ci, notamment pour réaliser l'extraction de substances, en particulier celles initialement incorporées dans le milieu, ou celles produites lors de l'incubation du milieu avec lesdites particules, et permettant optionnellement de recycler à l'intérieur du dispositif, notamment dans le récipient formant réservoir, le milieu prélevé, après le traitement précité.

En particulier, les moyens précités comprennent avantageusement une ou plusieurs colonnes d'extraction, disposées en série ou en parallèle, contenant un support chromatographique approprié.

On comprend que, lorsque les particules constituées par exemple de cellules ou d'agrégats cellulaires, sont en suspension, on puisse réaliser leur agitation par le biais de la circulation du milieu liquide. De manière à éviter, dans ce cas, que des particules ne se regroupent dans une zone du réacteur et ne soient plus en mouvement dans le liquide, on évitera les formes pouvant engendrer des volumes morts.

La présente invention fournit également un procédé pour réaliser la réaction de particules solides avec un milieu liquide, suivant lequel on met lesdites particules solides en contact avec ledit milieu liquide au moyen d'un dispositif selon l'invention.

Suivant un mode avantageux de mise en oeuvre du procédé de l'invention, lesdites particules solides sont maintenues en suspension, au moins par intermittence, dans le milieu liquide, notamment en régime de lit fluidisé, grâce à la circulation de ce milieu au travers de l'enceinte précitée.

Dans un mode de réalisation avantageux du procédé selon l'invention, l'enceinte est entièrement remplie de liquide, mais on peut ajouter du milieu liquide en cours de réaction à l'intérieur de l'enceinte précitée, en augmentant le volume de ladite enceinte par déplacement du piston, ce qui permet notamment de maîtriser à volonté la densité volumétrique desdites particules solides par l'apport de milieu liquide en cours de réaction.

De plus, dans un mode de réalisation du procédé de l'invention, on fait circuler le milieu liquide de façon continue ou intermittente à travers l'enceinte, éventuellement en inversant le sens de circulation régulièrement ou non, afin d'obtenir notamment une meilleure agitation, ainsi qu'une bonne répartition des particules en suspension dans l'enceinte et, si nécessaire, de décolmater les moyens de retenue précités, notamment les grilles.

Comme on l'a mentionné, lorsque le dispositif comporte à l'extérieur de l'enceinte des moyens de circulation comprenant des moyens de prélèvement du milieu et des moyens d'addition de milieu frais, on peut

renouveler partiellement ou entièrement le milieu liquide en cours de réaction.

5 Selon l'invention, le contrôle et la mesure de tous les paramètres de la réaction (température, teneur en  $O_2$ , teneur en  $CO_2$ , évolution des teneurs des composés du milieu, etc...) se fait hors de l'enceinte et ce au cours de la réaction.

10 Suivant une autre caractéristique du procédé de l'invention, on peut réaliser en cours de réaction, en continu ou par intermittence, l'extraction de substances présentes dans le milieu liquide, soit qu'elles y avaient été initialement incorporées, soit qu'elles y ont été produites au cours de la réaction, grâce aux moyens décrits précédemment, permettant de soutirer, traiter et/ou recycler une partie du milieu.

15 Suivant un mode de réalisation particulier, les particules précitées sont constituées en totalité ou en partie de matière vivante, l'autre partie pouvant être, dans le dernier cas, constituée d'une matière inerte, avantageusement une matière généralement utilisée par l'homme de l'art comme support ou matériau d'immobilisation, en particulier d'inclusion, de ladite matière vivante.

20 La matière inerte, en particulier celle destinée à être utilisée pour immobiliser ladite matière vivante, peut être par exemple constituée d'une matrice de polymère, tel qu'un polyacrylamide, d'un gel ionotrope, tel qu'un gel de carraghénane, ou un gel d'alginate de calcium, d'une protéine à haut poids moléculaire, telle que du collagène sous forme de micro-éponge, ou de verre, de préférence sous forme de billes poreuses.

25 La matière vivante précitée peut être composée de cellules, telles que des cellules eucaryotes ou procaryotes, notamment des microorganismes tels que bactéries, moisissures, levures, euglènes, micro-algues, des cellules de plantes, des cellules animales, des agrégats cellulaires différenciés ou non, tels que des "TIL" (Tumour Infiltrating Lymphocytes), des embryons végétaux, ou des organes végétaux tels que des racines, tubercules, nodules organogènes, des plantules telles que des micropopagules ou des protocormes, en particulier protocormes d'orchidée.

30 En particulier, pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention, on pourra utiliser des microorganismes de type flocculant.

35

Toutefois, lorsque la matière vivante est composée d'éléments de très petite taille, tels que des cellules isolées, des microorganismes, notamment des levures ou des bactéries, il est généralement préféré, pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention, d'immobiliser d'une manière appropriée connue de l'homme de l'art, par exemple par inclusion, lesdits éléments au moyen d'une matière inerte telle que précédemment définie.

Le procédé de l'invention peut en particulier être appliqué à un procédé de culture, notamment de fermentation le cas échéant, de particules constituées en totalité ou en partie de matières vivantes telles que précédemment définies, en milieu de culture liquide, suivant lequel l'on met les particules précitées en contact avec ledit milieu de culture liquide dans une chambre de culture, l'enceinte constituant ladite chambre de culture, lesdites particules solides comprenant les particules précitées, et le liquide étant ledit milieu de culture desdites particules.

Le procédé de culture selon la présente invention peut être appliqué avantageusement pour la production d'embryons somatiques de plante, en particulier de vigne et de rosier.

Un avantage de ce type de procédé, notamment appliqué à la culture d'une matière vivante telle que précédemment définie, en particulier cellules, agrégats cellulaires, embryons de végétaux, organes végétaux ou plantules, est de pouvoir s'affranchir de l'aération du milieu liquide directement dans la chambre de culture. En effet, des moyens d'aération tels que des cartouches d'oxygénation, peuvent être intégrés aux moyens de traitement du milieu de culture lors de la circulation à l'extérieur de la chambre de culture.

En ce qui concerne plus particulièrement les "TIL", on précise qu'au cours de leur préparation il y a un stade dans lequel ils se présentent sous forme de particules "pellets", obtenues après 7 jours de culture. Ainsi, au stade "pellets", les TIL peuvent être introduits dans le dispositif de l'invention, pour une production de masse. La possibilité qu'offre le dispositif de pouvoir fonctionner avec un très faible volume de milieu, surtout lorsque le récipient formant réservoir est mis hors-circuit, est ici particulièrement avantageuse car le milieu de culture est à un prix très élevé.

35



Selon encore un autre mode de mise en oeuvre du procédé de l'invention, lesdites particules solides peuvent être des particules constituées d'une substance active, en particulier une enzyme, immobilisée sur un support solide, selon un procédé quelconque, connu de l'homme de l'art, à faire réagir avec une ou plusieurs substances contenues dans, ou  
5 constituant, le liquide.

On peut aussi appliquer le procédé selon l'invention, n à la transformation de molécules par des cellules végétales ou animales ou des microorganismes lorsque lesdites molécules sont comprises dans le milieu  
10 liquide.

Le procédé selon l'invention peut être aussi appliqué dans des procédés de réactions catalytiques, en particulier lorsqu'un réacteur à lit fluidisé est requis, lesdites particules consistant dans un catalyseur.

Par le procédé selon l'invention, on peut effectuer la  
15 production de molécules, telles que des protéines, des polyphénols, des terpènes, des alcaloïdes, des stérols, des rétinoïdes ou des vitamines.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière de la description détaillée qui va suivre, donnée uniquement à titre d'illustration et qui ne saurait par conséquent limiter  
20 d'aucune façon la portée de l'invention.

La Figure 1 représente un schéma général d'un dispositif selon l'invention.

La Figure 2 représente un mode de réalisation des moyens d'extraction permettant l'extraction et la séparation de substances du  
25 milieu liquide.

La Figure 3 représente, en coupe, un mode de réalisation de l'enceinte du réacteur.

Un dispositif plus particulièrement adapté à la culture cellulaire, mais non exclusivement, est décrit sur les Figures 1 à 3.

30 Dans le dispositif de la Figure 1 sont représentés en :

1 = la paroi mobile de l'enceinte

1a = grille de retenue des particules incorporée à la paroi mobile

2 = un tuyau et pince d'isolement pour pompe de décolmatage

- 3a = le moyen d'alimentation et évacuation du liquide de l'enceinte dans le piston de réglage du volume utile
- 3b = le moyen d'alimentation et d'évacuation du liquide à l'extrémité inférieure de l'enceinte
- 5      4 = la colonne cylindrique
- 5 = l'enceinte à volume variable
- 6 = une grille de retenue des particules
- 7 = une pince d'isolement
- 8 = une pompe de circulation à débit variable et/ou inversable
- 10      9 = un tuyau de soutirage du milieu
- 10 = un récipient formant réservoir de milieu liquide
- 11 = un tuyau de retour de milieu
- 12 = une pince d'isolement
- 15      13 = une ouverture obturable notamment pour l'introduction de cellules dans l'enceinte
- 14 = un filtre de stérilisation
- 15 = une cartouche d'oxygénation
- 16a = arrivées de milieu de culture frais, ou différents gaz par bullage, tels que  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $N_2$
- 20      16b = homogénéisateur de milieu
- 17, 18a, 18b = des pinces d'isolement
- 19a, b, 19-1, 19-2, 19-3 = les canalisations du circuit extérieur à l'enceinte
- 21 = le piston de réglage du volume

25      La Figure 1, la colonne cylindrique 4 constituant l'enceinte 5 à volume variable est terminée à chacune de ses extrémités par une forme conique. La paroi mobile 1 de l'enceinte est constituée par la base du piston 21. Le piston coopère de manière étanche avec l'intérieur de la colonne cylindrique 4 par un joint torique 23 (Figure 3). Le piston inclut les

30      moyens 3a d'alimentation ou d'évacuation du liquide à l'extrémité supérieure de la colonne 4. A la base de la colonne, les moyens 3b permettent également l'alimentation ou l'évacuation du liquide. Les particules sont retenues dans l'enceinte par des grilles de maille  $30\mu$ , l'une (1a) incluse dans la base du piston 21, l'autre (6) à la base de la colonne.

35

Dans l'exemple représenté aux Figures 1 et 3, lorsque le piston est en position où l'enceinte a son volume maximum, l'enceinte communique avec une ouverture 13 permettant l'introduction ou le prélèvement de liquide ou l'introduction de particules dans l'enceinte.

5 Sur la Figure 1 sont représentés des moyens de circulation et traitement du liquide en dehors de l'enceinte, comportant une canalisation (19a, 19b, 19-1, 19-2, 19-3), une pompe péristaltique 8 à débit variable permettant de faire varier le débit du milieu liquide et/ou d'inverser le sens du courant. Tel que représenté sur la Figure 1, lorsque le liquide  
10 circule du haut vers le bas à l'intérieur de l'enceinte, il circule à l'extérieur par les canalisations (3b, 19a, 19-1, 19-b, 3a), les pinces 18a et 18b sont fermées, les pinces 7, 17 et 12 sont ouvertes. Lorsque le liquide circule dans l'autre sens, on peut faire circuler le liquide par les canalisations en dérivation 19-3 et 19-2, en passant par le récipient-réservoir 10, dans ce  
15 cas il faut ouvrir les pinces 18a et 18b et fermer la pince 17.

Sur la Figure 2 sont représentés les moyens conventionnels de soutirage, extraction et séparation de substances du milieu liquide à partir du récipient 10 :

- 25 = un tuyau de soutirage pour extraction de composés du milieu
- 20 26 = un filtre de stérilisation
- 27 = une pompe de circulation à débit variable
- 28 = un robinet à trois voies
- 29 = une colonne de support chromatographique
- 30 = un robinet à trois voies
- 25 31 = une pompe de circulation à débit variable
- 32 = un filtre de stérilisation
- 33 = un retour de milieu après extraction de composés

Sur la Figure 2, on peut imaginer que la colonne de support chromatographique 29 soit remplacée par plusieurs colonnes différentes, en  
30 série ou en parallèle, pour permettre l'extraction alternative de composés différents.

Sur la Figure 3, qui montre un mode de réalisation d'une enceinte du réacteur adapté en particulier à la culture de cellules,

d'agrégats cellulaires, d'embryons ou de racines, sont représentés en :

- 20 = le couvercle de la colonne cylindrique
- 21 = le corps du piston
- 22 = une hotte cylindrique solidaire du piston
- 5 23 = un joint torique
- 24 = un joint plat.

Sur la Figure 3, le couvercle 20 de la colonne cylindrique 4 est amovible, ce qui peut permettre, après avoir dégagé le piston, de vidanger les particules solides telles que des racines, le cas échéant.

10 Sur la Figure 3, la base du cylindre 4 est disposée en butée sur la grille 6, elle-même venant en butée sur un joint plat 24 de façon étanche.

On décrit ci-après, à titre illustratif, un processus de régénération de production d'embryons végétaux, où les dispositif et  
15 procédé selon l'invention interviennent dans les trois étapes du processus suivantes :

- la multiplication d'agrégats cellulaires et/ou de cellules,
- la maturation des agrégats cellulaires en embryons, et
- 20 - la phase de traitement des embryons pour induire leur germination en plantes.

Il est à noter que, pour des raisons de simplification, dans la présente description et les revendications ci-après, on désigne, par le terme "maturation" aussi bien le développement d'agrégats cellulaires ou d'embryons que leur maturation proprement dite, ces deux processus étant  
25 sucessifs ou plus ou moins simultanés en fonction des conditions de culture et/ou des espèces végétales considérées.

#### 1) Remplissage de l'enceinte en milieu de culture

L'initiation de la maturation des pro-embryons se fait dans  
80 ml de milieu de culture. Le piston est relevé dans la position  
30 correspondant à ce volume. On ferme les tuyaux 2 et 13.

La pompe péristaltique 8 raccordée au tuyau de soutirage 9 et au tuyau 19a permet le remplissage par le tuyau 3b au bas de la colonne, à partir du récipient 10. Lorsque l'enceinte est remplie, le milieu ressort par le tuyau 3a puis 19b par le haut. On branche le circuit sur le réservoir de  
35

milieu 10 en raccordant les tuyaux 19b et 11 et on remplit l'enceinte et l'on autoclave le tout 20 minutes à 120°C. Le réservoir contient environ 1 l de milieu de type Murashige et Skoog bien connu de l'homme de l'art, sans hormone de croissance.

5    2) Introduction des cellules sous forme d'agrégats

Après autoclavage, le dispositif est placé sous le flux d'une hotte afin de manipuler stérilement. On ouvre les tuyaux 2 et 13 et on relève le piston au maximum. On introduit 80 µl de cellules sous forme d'agrégats par ml de milieu par le tuyau 13 et on rince avec 1 ml de milieu  
10    stérile. On abaisse le piston au maximum pour éliminer l'air. Puis on ferme les tuyaux 2 et 13. On peut alors faire fonctionner la pompe 8 qui fera circuler le liquide dans la colonne 4, ce qui aura pour effet de mettre en suspension les fins agrégats (200 µm à 500 µm) dans les 80 ml de milieu de culture. Avantagusement, on fait fonctionner la pompe 8 en régime de  
15    débit variable, en faisant alterner des périodes de débit important et des périodes de débit faible, voire nul, ce qui a pour effet de maintenir une agitation au sein des agrégats en suspension. En variante, pour apporter le minimum de milieu, on peut relier directement 19a à 19b, par l'intermédiaire de la canalisation 19-1, et faire circuler en circuit fermé. On  
20    bénéficie ainsi généralement de l'effet positif de certains facteurs de croissance. De plus, dans ce cas, il est possible, et même avantageux, de faire fonctionner la pompe non seulement en régime variable comme décrit ci-dessus, mais aussi alternativement en sens inverse pour améliorer encore l'agitation au sein des agrégats.

25    3) Culture des embryons somatiques

Au bout de quatre jours de culture, le volume de la culture est augmenté en relevant le piston de quelques centimètres. On procède ainsi pendant 12 jours en augmentant chaque jour le volume de 30 ml environ pour atteindre un volume final de 450 à 500 ml (volume maximum de la  
30    chambre). On peut également, deux à trois fois au cours de la culture des embryons, renouveler complètement le milieu en vidant la colonne et le réservoir et en réalimentant le récipient 10 de milieu de culture frais par le tuyau 16a. On procède comme pour vider et arrêter le circuit, comme indiqué ci-après.

35

#### 4) Arrêt de la culture des embryons somatiques

Après avoir ouvert le tuyau 2, on effectue le pompage du milieu contenu dans la colonne vers le réservoir avec la pompe 8 ; la chambre 5 se vide de milieu et les embryons se déposent sur le filtre 6 (grille) au bas de la colonne 4. On dévisse et soulève la colonne 4 (Figure 3) stérilement. On récupère le filtre 6 et les embryons qui se sont développés, et qui possèdent racines et cotylédons. Il est maintenant possible de les séparer et de les repiquer un par un sur un substrat approprié.

#### Analyse comparative:

1) Première étape : multiplication des agrégats cellulaires.

Dans le système traditionnel de culture, l'ensemencement est réalisé à une densité de 20  $\mu$ l de cellules par ml, dans 80 ml de milieu, dans un erlen de 250 ml. Après 15 jours de culture, la densité est de 80 microlitres par ml. A cette densité, le fractionnement en 4 erlens est nécessaire, sinon il se produit une nécrose des cellules. Cette opération est manuelle, et le risque de contamination microbienne est important.

Grâce au procédé du dispositif de l'invention, à l'aide du piston mobile, il est possible de ramener la densité à 20  $\mu$ l d'agrégats cellulaires par ml de milieu en ajoutant automatiquement du milieu de culture sans risque de contamination exogène, ce qui est un atout indispensable pour une mise en oeuvre industrielle.

2) Deuxième étape = maturation et passage du stade agrégat cellulaire au stade embryon en forme de coeur.

Dans le système traditionnel, la densité de départ est de 1 à 2  $\mu$ l de cellules par ml, et atteint 40  $\mu$ l d'agrégats cellulaires par ml après 15 jours de culture (dans un erlen de 250 ml, contenant 80 ml de milieu). Or, il est nécessaire durant les 15 jours de maturation, de rester à une densité de 1 à 2  $\mu$ l de cellules par ml, sinon il y a blocage du développement des cellules en embryons. L'apport manuel fréquent de milieu complémentaire n'est pas envisageable en application industrielle.

Par ailleurs, les cellules peuvent relarguer dans le milieu des inhibiteurs de type protéique et autres, qu'il est problématique d'éliminer de l'erlen.

Le procédé et dispositif de l'invention permettent de maintenir la densité volumétrique d'agrégats cellulaires comme on l'a vu et, en outre, le couplage d'un système de filtration approprié (25 à 33) sur les circuits de circulation extérieurs à la chambre de culture 5 permet d'éliminer périodiquement ou en continu les molécules du type inhibiteur.

3) Troisième étape : passage du stade coeur au stade embryon ayant une racine et deux cotylédons.

Pour avoir un développement correct des embryons, il est nécessaire, à cette étape, de remplacer le milieu de culture par un milieu différent, et ce, progressivement. Cette opération est techniquement problématique en erlens.

L'intérêt du procédé et dispositif de l'invention est là encore déterminant. De plus, pour la maturation et le traitement du milieu de culture, les procédés et dispositifs de l'invention permettent de contrôler et de mesurer les différents paramètres :  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $N_2$ , température, agitation, PH et composition du milieu de culture, sans risquer de détériorer, ou blesser les embryons et les agrégats cellulaires.

20

25

30

35

## REVENDECATIONS

1. Dispositif du type réacteur destiné à mettre en contact des particules solides avec un liquide, comportant :

- 5 - une enceinte (5) délimitée par des parois, destinée à se remplir dudit liquide et à contenir lesdites particules solides en contact avec le liquide,  
- des moyens (3a, 3b) d'alimentation et d'évacuation du liquide de l'enceinte,  
caractérisé en ce qu'au moins l'une desdites parois (1) de l'enceinte peut  
10 être mobile de sorte que l'enceinte a un volume variable.

2. Dispositif selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'enceinte (5) définit, en partie au moins, un cylindre, ladite paroi mobile (1) de l'enceinte étant constituée par une base mobile du cylindre.

15

3. Dispositif selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'enceinte (5) définit, en partie au moins, un cylindre (4) qui coopère de façon étanche avec un piston (21) lequel peut être déplacé à l'intérieur du cylindre de manière à faire varier le volume de l'enceinte en  
20 fonction de sa position, la base (1) du piston constituant une paroi mobile (1) de l'enceinte.

4. Dispositif selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'enceinte est constituée d'une colonne cylindrique (4), les moyens d'alimen-  
25 tation et évacuation du liquide étant situés à chaque extrémité de celle-ci et l'une de ces extrémités étant constituée par ledit cylindre et ledit piston, le piston incluant un moyen (3a) d'alimentation ou d'évacuation du liquide de l'enceinte à l'une des extrémités de la colonne (4), un autre moyen (3b) d'alimentation ou d'évacuation du liquide étant situé à l'autre  
30 extrémité.

5. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'il comporte des moyens (1a, 6) de retenue desdites particules et séparation d'avec le liquide pour maintenir celles-ci à l'intérieur de  
35 l'enceinte.



6. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ladite paroi mobile (1), notamment la base du piston (21), comporte un moyen (1a) de retenue des particules solides et séparation d'avec le liquide.

5

7. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que l'enceinte est constituée d'une colonne cylindrique comportant une paroi cylindrique et deux parois d'extrémités formant les bases du cylindre, ces dernières comportant des grilles (1a, 6) permettant la circulation du milieu liquide dans l'enceinte, mais retenant les particules à l'intérieur de l'enceinte, l'une au moins de ces deux grilles étant mobile.

10

8. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que l'enceinte comporte une ouverture (13) obturable pratiquée dans sa paroi, permettant l'introduction, ou le prélèvement, partielle ou totale du milieu, ou encore permettant l'introduction de particules dans l'enceinte.

15

9. Dispositif selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite ouverture (13) communique avec l'intérieur de l'enceinte uniquement lorsque le volume de celle-ci est maximum.

20

10. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le dispositif comprend des moyens de circulation et traitement du liquide en dehors de l'enceinte, comportant une canalisation (19-2, 19-a, 19-b, 19-3), une pompe (8) de préférence à débit variable et de préférence encore étant du type permettant d'inverser le sens du courant du milieu liquide et éventuellement un récipient (10) formant réservoir de milieu liquide, et des pinces d'isolement (7, 12, 18a, 18b) situées respectivement à l'entrée et à la sortie de l'enceinte et dudit récipient (10).

25

30

11. Dispositif selon la revendication 10, caractérisé en ce que ledit récipient (10) comporte différents moyens (16b) pour contrôler, modifier et/ou homogénéiser la composition du milieu liquide, tels que par

35

exemple des capteurs mesurant la température, le pH ou la concentration des gaz dissous, et des moyens (16a) de prélèvement du milieu ou d'addition de différentes substances ou compositions telles que milieu frais ou constituants de ce milieu, sous forme liquide, dissoute et/ou gazeuse.

5

12. Dispositif selon la revendication 10 ou 11, caractérisé en ce qu'il comprend une canalisation supplémentaire (19-1), munie de préférence d'une pince d'isolement (17), permettant de réaliser une boucle de circulation du milieu liquide, ladite boucle incluant l'enceinte (5) et la pompe (8), mais isolant le récipient (10) formant réservoir de milieu.

10

13. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'il comporte en outre, notamment au niveau dudit récipient (10) formant réservoir, des moyens (25 à 33) permettant de soutirer, en alternance ou en continu, au moins une partie du milieu et de traiter celui-ci, notamment pour réaliser l'extraction de substances, en particulier celles initialement incorporées dans le milieu, ou celles produites lors de l'incubation du milieu avec lesdites particules, et permettant optionnellement de recycler à l'intérieur du dispositif, notamment dans le récipient (10), le milieu prélevé, après le traitement précité.

15

20

14. Dispositif selon la revendication 13, caractérisé en ce que les moyens (25 à 33) précités comprennent une ou plusieurs colonnes d'extraction, disposées en série ou en parallèle, contenant un support chromatographique approprié.

25

15. Procédé destiné à réaliser la réaction de particules solides avec un milieu liquide, dans lequel on met lesdites particules en contact avec ledit milieu liquide au moyen d'un dispositif selon l'une des revendications 1 à 14.

30

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que lesdites particules solides sont maintenues en suspension, au moins par intermittence, dans le milieu liquide, notamment en régime de lit fluidisé, grâce à la circulation de ce milieu au travers de l'enceinte (5) précitée.

35

17. Procédé selon la revendication 15 ou 16, caractérisé en ce que l'enceinte (5) est entièrement remplie de liquide, et que l'on ajoute du milieu liquide en cours de réaction à l'intérieur de l'enceinte (5), en augmentant le volume de ladite enceinte par déplacement du piston (21),  
5 ce qui permet notamment de maîtriser à volonté la densité volumétrique desdites particules solides par l'apport de milieu liquide en cours de réaction.

18. Procédé selon l'une des revendications 15 à 17, caractérisé  
10 en ce qu'on fait circuler le milieu liquide de façon continue ou intermittente à travers l'enceinte (5), éventuellement en inversant le sens de circulation régulièrement ou non, afin d'obtenir notamment une meilleure agitation, ainsi qu'une bonne répartition, des particules en suspension dans l'enceinte (5), et, si nécessaire, de décolmater les moyens de retenue (1a, 6)  
15 précités, notamment les grilles.

19. Procédé selon l'une des revendications 15 à 18, caractérisé en ce que l'on renouvelle partiellement ou entièrement le milieu liquide en cours de réaction grâce aux moyens (16a) de prélèvement du milieu et  
20 d'addition de milieu frais, précités.

20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 15 à 19, caractérisé en ce que la mesure de tous les paramètres de la réaction tels que température, teneur en  $O_2$ , teneurs en  $CO_2$  et évolution des teneurs  
25 des composés du milieu, se fait hors de l'enceinte (5), et ce au cours de la réaction.

21. Procédé selon l'une des revendications 15 à 20, caractérisé en ce que l'on réalise en cours de réactions, en continu ou par intermit-  
30 tence, l'extraction de substances présentes dans le milieu liquide, soit qu'elles y avaient été initialement incorporées, soit qu'elles y ont été produites au cours de la réaction, grâce aux moyens (25 à 33) décrits précédemment, permettant de soutirer, traiter et/ou recycler une partie du milieu.

35

22. Procédé selon l'une des revendications 15 à 21, caractérisé en ce que les particules précitées sont constituées en totalité ou en partie de matière vivante, l'autre partie étant, dans le dernier cas, constituée d'une matière inerte, avantageusement une matière généralement utilisée par l'homme de l'art comme support ou matériau d'immobilisation, en particulier d'inclusion, de ladite matière vivante.

23. Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que la matière inerte, en particulier celle destinée à être utilisée pour immobiliser ladite matière vivante, est constituée d'une matrice de polymère, tel qu'un polyacrylamide, d'un gel ionotrope, tel qu'un gel de carraghénane ou un gel d'alginate de calcium, d'une protéine à haut poids moléculaire, telle que du collagène sous forme de microéponge, ou de verre, de préférence sous forme de billes poreuses.

24. Procédé selon la revendication 22 ou 23, caractérisé en ce que la matière vivante est composée de cellules, telles que des cellules eucaryotes ou procaryotes, notamment des microorganismes tels que bactéries, moisissures, levures, euglènes, micro-algues, des cellules de plantes, des cellules animales, des agrégats cellulaires différenciés ou non, tels que des "TIL" (Tumour Infiltrating Lymphocytes), des embryons végétaux, ou des organes végétaux tels que des racines, tubercules, nodules organogènes, des plantules telles que des micropopagules, des protocormes, en particulier protocormes d'orchidée.

25. Procédé selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce qu'il est appliqué à un procédé de culture, notamment de fermentation le cas échéant, de particules constituées en totalité ou en partie de matières vivantes telles que précédemment définies, en milieu de culture liquide, suivant lequel l'on met les particules précitées en contact avec ledit milieu de culture liquide dans une chambre de culture, l'enceinte (5) constituant ladite chambre de culture, lesdites particules solides comprenant les particules précitées, et le liquide étant ledit milieu de culture desdites particules.

26. Procédé selon l'une des revendications 22 à 25 appliqué à la transformation de molécules par des cellules animales ou végétales, ou de microorganismes, lorsque lesdites molécules sont comprises dans ledit milieu liquide.

5

27. Procédé selon l'une des revendications 15 à 21 caractérisé en ce que lesdites particules solides sont des particules constituées d'une substance active, en particulier une enzyme, immobilisée sur un support solide, à faire réagir avec une ou plusieurs substances contenues dans, ou

10

28. Procédé selon l'une des revendications 15 à 24, appliqué dans des procédés de réactions catalytiques, en particulier lorsqu'un réacteur à lit fluidisé est requis, lesdites particules consistant dans un

15

29. Procédé selon l'une des revendications 15 à 28, appliqué à la production de molécules, telles que des protéines, des polyphénols, des terpènes, des alcaloïdes, des stéroïdes, des rétinoïdes ou des vitamines.

20

30. Procédé selon la revendication 25, appliqué à la production d'embryons somatiques de plante, en particulier de vigne et de rosier.

25

30

35

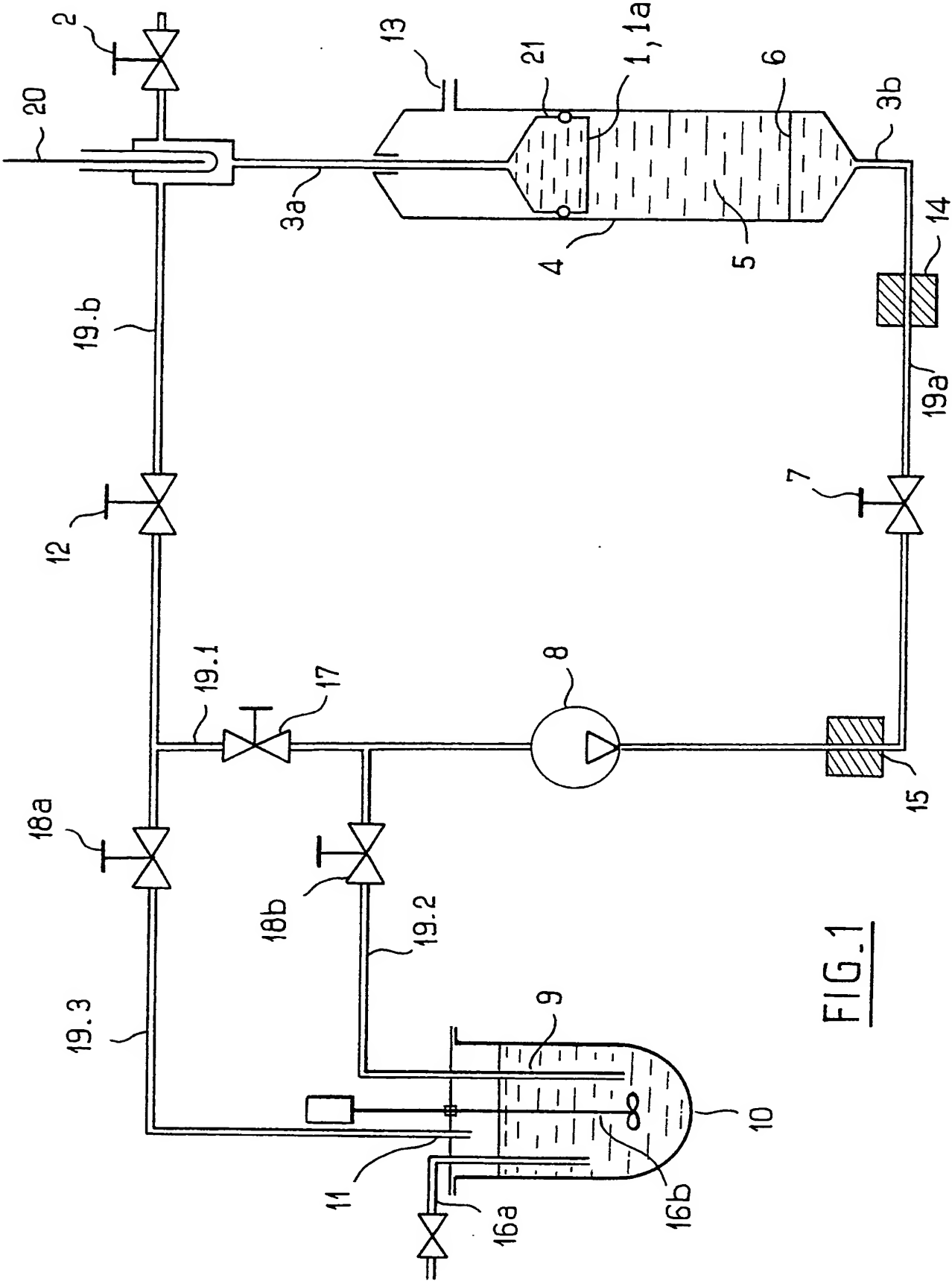
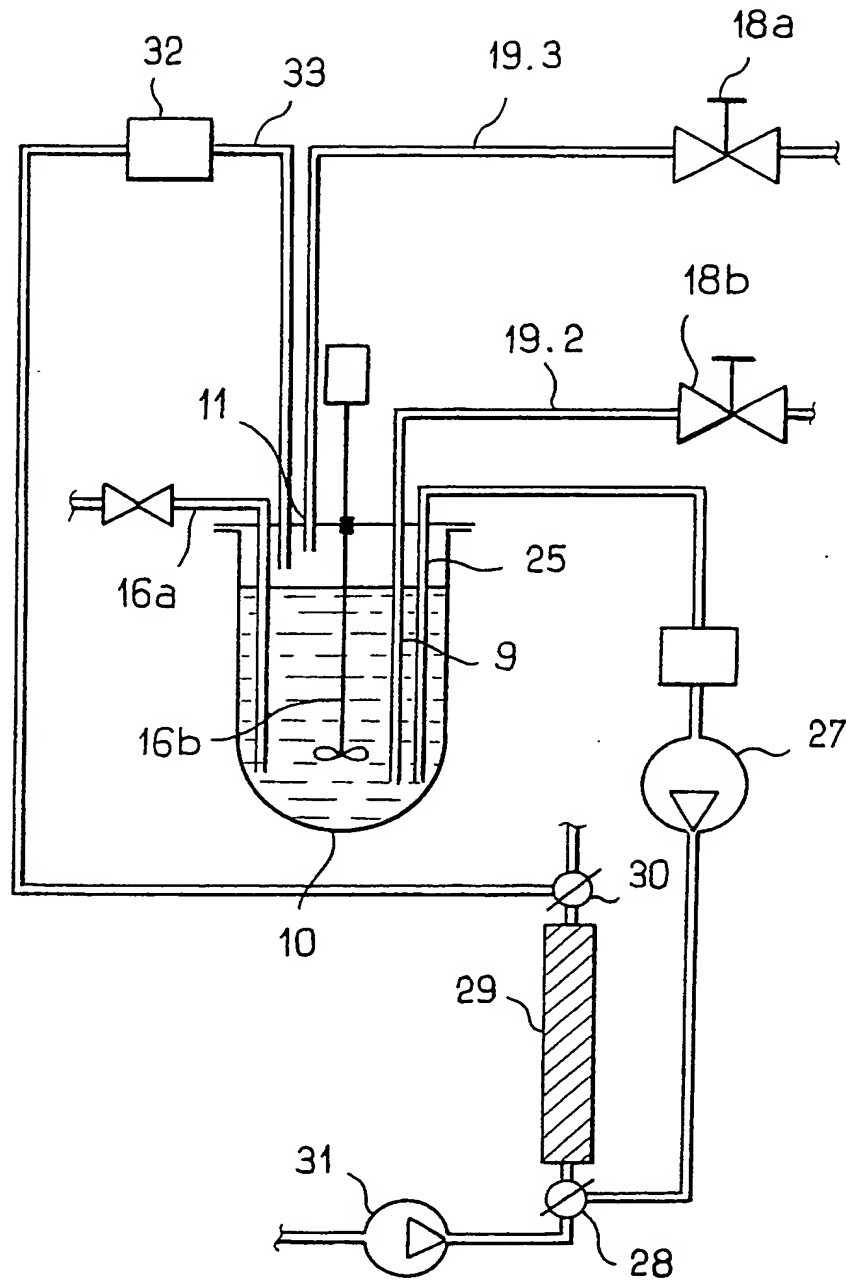
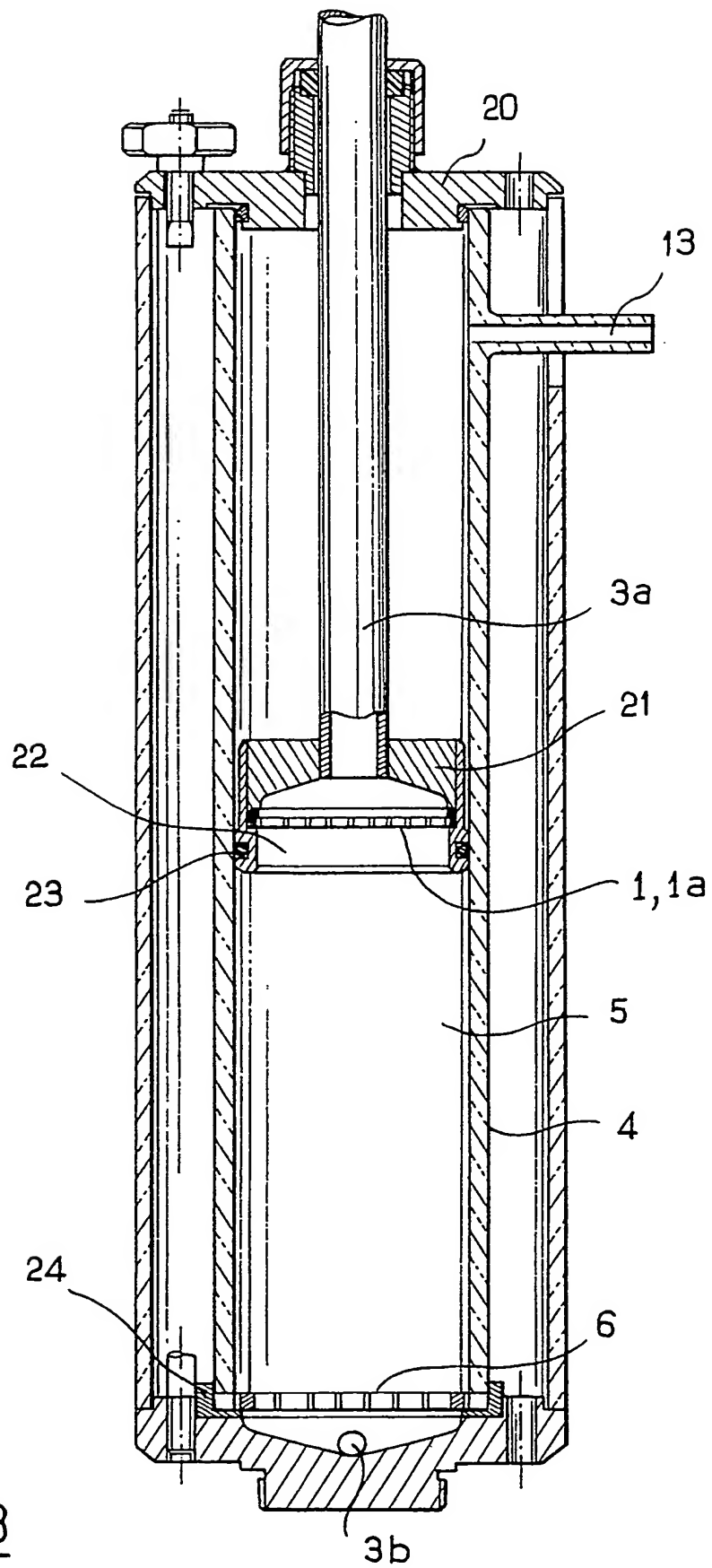


FIG. 1

FIG. 2

3 / 3

FIG. 3



INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9205579  
FA 470721  
Page 1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	EP-A-0 428 800 (NGK INSULATORS, LTD.) * le document en entier *	1-5
X	DE-A-3 327 541 (W. WISSUSEK) * page 20, ligne 9 - ligne 26; figure 1 *	1
X	EP-A-0 473 011 (FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH) * le document en entier *	1-5
Y		6-7, 13-19, 21-30
Y	EP-A-0 322 749 (R & D ASSOCIATION OF BIOREACTOR SYSTEM) * le document en entier *	6-7, 13-19, 21-30
A	FR-A-2 507 496 (SA DUMONT ENGINEERING ET COMPAGNIE) * le document en entier *	1-9
A	FR-A-2 519 651 (J. MILOIS) * page 2, ligne 24 - page 3, ligne 11; figure 1 *	5-6
A	CHEMIKER-ZEITUNG vol. 108, no. 5, Mai 1984, HEIDELBERG DE pages 165 - 176 E.A. STADLBAUER & C. TRIEU 'Biogasanlagen: Nutzung des mikrobiellen Lebensraums bei der Entsorgung.' * figure 13 *	11-14
A	EP-A-0 269 086 (RIKAGAKU KENKYUSHO & SHINKO-PFAUDLER COMPANY) * colonne 4, ligne 19 - colonne 7, ligne 13; revendications; figures *	5, 11, 13, 15-16, 19-30
Date d'achèvement de la recherche 17 DECEMBRE 1992		Examinateur BEVAN S.R.
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

EPO FORM 1503 (03.92) (PX12)

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9205579  
FA 470721  
Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	FR-A-1 589 364 (INTERMAG GMBH)  -----	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. C1.5)
Date d'achèvement de la recherche 17 DECEMBRE 1992		Examinateur BEVAN S.R.
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire  T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant		

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)